基于微流控芯片的体外血脑屏障模型构建

蒋丽莉，郑峻松，李艳，邓均，方立超，黄辉*

（第三军医大学第一附属医院临床检验学教研室，重庆 400038）

摘　要：目的　利用微流控芯片技术构建易调控、接近在体微环境的体外血脑屏障模型。 **方法** 微流控芯片体外模型采用上下双培养池结构，由多聚碳酸酯膜分隔，两套流路系统控制流体。细胞采用原代分离纯化的大鼠脑血管内皮细胞和星形胶质细胞，免疫荧光技术进行鉴定，分别按次序注入微流控芯片上下培养池，按1μL/min的流速进行灌注培养，构建体外血脑屏障模型，并对此模型进行鉴定和评价。**结果** 原代分离纯化得到两种细胞，免疫荧光法鉴定细胞纯度达95%以上。共培养3天紧密连接开始形成，5天达到峰值，超微结构观察显示内皮细胞之间形成紧密连接，且荧光素钠渗透实验和TEER值测量表明屏障形成良好。 **结论**　成功构建微流控芯片体外血脑屏障模型，可成为一个新的平台应用于药物筛选、神经系统基础等多项研究中。

关键词　微流控芯片；血脑屏障模型；在体微环境

Construction of Blood-Brain Barrier In Vitro Model Based on Microfluidic Chip

*Jiang Li-li，Zheng Jun-song，Li Yan，Deng Jun，Fang Li-chao，　Huang Hui**

(Department of Clinical Laboratory Medicine，The First Affiliated Hospital，Third Military Medical University ，Chongqing ，China 400038）

Abstract*　：*Objective *To create a blood-brain barrier in vitro model by microfluidic chip technology, which were easy to control and close to microenvironment.* ***Methods*** *The microfluidic chips were composed of dual pool structure, separated by the polycarbonate membrane, and there were two sets of flow control system, mouse brain vascular endothelial cells and astrocytes were isolated and purified, the cells were identified by immunofluorescence. Then cells were added to the two pools according to the order, and infused at 1μL/min flow rate. The blood-brain barrier （BBB）　model was constructed, and then identified and evaluated.* ***Results*** *Two kinds of cells*

* 基金项目：国家自然科学基金面上项目 31371016

第三军医大学第一附属医院青年人才创新基金 SWH2014QN05

***通信作者：**黄辉，电话;(023)68772701，E-mail：huanghui@tmmu.edu.cn

were obtained by isolation and purification, and the cells were identified by immunofluorescence and the purity was above 95%. After 3 days of co-culture, tight junctions began to develop, and the peak is on the fifth day, the ultrastructural observation showed that the mouse brain vascular endothelial cells formed tight junctions, the penetration experiments of fluorescein sodium and the measurement of TEER showed that barrier formation was good. ***Conclusion*** *The blood-brain barrier model was constructed based on the microfluidic chip, It may become a new platform for drug screening, neural system basis and other studies.*

***Key Words*：** *Microfluidic chip；Blood-brain barrier model；Microenvironment*

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)在脑内药物传递中起关键作用，且与神经系统疾病如阿尔茨海默病和中风的发病机制相关。而BBB功能不仅取决于内皮细胞的表型，还取决于不同结构和细胞间的相互作用，这成为了目前中枢神经系统研究的重点[1]。然而要想保持其稳定的结构和功能，则需建立一种能较好模拟在体情况的血脑屏障体外模型，本实验针对目前血脑屏障模型不能很好地调控细胞微环境的不足，利用微流控芯片技术，构建了新型体外血脑屏障模型，实现在时间和空间上的精确调控，更接近在体微环境。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新生 SD 大鼠(第三军医大学动物中心)，聚二甲基硅烷(Polydimethylsiloxane，PDMS，北京华贸达科技有限公司)，胎牛血清(Gibco)，内皮细胞生长因子（Endothelial Cell Growth supplements，ECGs，ScienCell)、DMEM/F12 培养基(Hyclone)、胰蛋白酶（Hyclone），Ⅵ型胶原酶(Sigma), Ⅱ型胶原酶(Invitrogen), DNAaseI(碧云天公司), 胶原酶/分散酶(Roche), Ⅰ型鼠尾胶原(BD)，血管性血友病因子（von Willebrand factor，vWF,博士德)，胶质纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein，GFAP，博士德)，荧光素钠(阿拉丁)，FITC-羊抗兔二抗(博士德)，TRITC 羊抗鼠二抗(博士德），聚碳酸酯膜(孔径 0.4μm，PC，Millipore)，等离子键合仪(型号 PDC-MG,成都铭恒科技发展有限公司)，Millincell-ERS 细胞电阻仪(Millipore)。

1.2 方法

1.2.1 微流控芯片设计与制作

微流控芯片选用材料PDMS制作，因其具有良好的生物兼容性，对气体有较

好的通透性，保证了细胞培养过程中O_2和CO_2气体的交换。设计芯片采用双培养池结构，分别形成NVU 的血管端和神经端，中间由多孔聚碳酸酯膜分割,分别由两套流路系统进行控制,以实现模拟在体情况的血脑屏障模型构建。首先对微流控芯片几何图案和尺寸设计进行模拟分析（Conventorware软件），设计中主要考虑芯片几何图形和通道大小、芯片内流体控制及细胞引入方式等。设计好后采用SU-8光刻技术制备硅片阳模。而后利用硅片阳模采用模塑法制备PDMS芯片，将PDMS预聚物倒于SU-8模具上，于90℃烘箱中加热1h，使PDMS聚合为稳定固态结构[2]。最后将固化PDMS层与模具分离，再将带有微流体管道结构的区域裁下，形成上片和下片两层结构，最后将PDMS上片和下片微通道面与裁剪好的聚碳酸酯膜用等离子键合仪照射，将多孔聚碳酸酯膜夹在PDMS上片和下片中间，显微镜下对齐键合，制成微流控芯片。

1.2.2 原代脑血管内皮细胞分离培养

取1-7天龄SD大鼠两侧大脑皮质，采用两步酶消化法和梯度离心法进行原代大鼠脑血管内皮细胞的分离培养[3]。培养至七天，细胞铺满瓶底胰蛋白酶消化传代。用荧光免疫法鉴定vWF表达，荧光显微镜观察并拍照。

1.2.3原代脑星型胶质细胞培养

取1-7天龄SD大鼠两侧大脑皮质，通过胰蛋白酶消化及200目筛网过滤，种植时利用差速贴壁法进行原代大鼠星形胶质细胞的分离培养[3]。经振摇纯化传代至第四代细胞，用荧光免疫法鉴定GFAP表达，荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 体外血脑屏障微流控芯片模型的构建

芯片用 75%乙醇冲洗，浸泡过夜，置于超净工作台上用高温高压灭菌后的三蒸水冲洗，注入鼠尾胶原（1:40 的比例用 30%乙醇配制）于上层芯片里聚碳酸酯膜上包被，放入超净工作台吹干。翻转微流控芯片，在微流控芯片下侧培养池接种已纯化至第四代星型胶质细胞，用微流泵每天按照 1μL/min 的流速进行灌注2h 换液，培养 2 天。将微流控芯片翻转至正面，在上层细胞培养池加入纯化鉴定后传一代的脑微血管内皮细胞，用另一套流路系统通入内皮细胞完全培养基，4℃共培养观察。

1.2.5 体外血脑屏障微流控芯片模型的鉴定和评价。

（1）透射电镜观察细胞形态及紧密连接

取共培养融合的微流控芯片BBB模型，将培养池的分隔膜剪下，经固定、脱水、浸泡，包埋后固化，分离、修复和定位后，制作超薄切片。染色和透射电镜观察细胞形态和紧密连接。

（2）荧光素钠渗透实验评价BBB模型通透性

将共培养融合的微流控芯片BBB模型置于六孔板中，上下培养池区域PDMS切胶开孔，上下加入DMEM/F12培养基37℃孵箱预热15min，弃去培养基，上层培养池区域加入0.5ml DMEM/F12包含浓度1mg/mL的荧光素钠溶液，下侧孔板加入1.5ml DMEM/F12液，分别在15、30、45、60、75、90min时间点将微流控芯片BBB模型转移到另一下池有2.5ml DMEM/F12的六孔板中。吸取各孔中下池液体各1ml用酶标仪测定OD值（激发波长：485nm，发射波长：535nm）。以空白微流控芯片作为对照。重复测量十次，计算各个时间点平均值和标准差作图。

（3）通过测量跨细胞电阻TEER对微流控芯片BBB模型的屏障功能进行评价。

用 Millicell-ERS 电阻仪测量 TEER 值，测量前校正仪器。电极短端浸入到芯片上层培养液中(注意不要和细胞层接触)，长端浸入到芯片下层培养液中。以动态跨内皮细胞间电阻的测量(TEER)峰值判断微流控芯片 BBB 模型紧密连接的形成。测量=实测－空白。去除膜面积影响的校正公式：测量值($\Omega\cdot cm^2$) =细胞单层值（Ω）×膜面积(cm^2)。重复测量十次，计算各个时间点平均值和标准差作图。

2 结果

2.1 微流控芯片设计与制作

Conventorware 软件设计的芯片为双培养池双流路系统，采用 PDMS 与 PDMS 键合，两个培养池长 20mm，宽 4mm，高 100μm，上层为血管端，下层为神经端，神经端设计了 u 型槽，既防止细胞培养池凹陷，又使细胞分布均匀（图 1(a)、(b)）。采用 SU-8 光刻技术制备好的硅片阳模（图 1(e)）。芯片组装示意图中，芯片上下培养池中间用 0.4μm 孔径的多孔聚碳酸酯膜隔开，此孔径使细胞间既有物质信号交流，又能物理分隔，多孔聚碳酸酯膜上层种植微血管内皮细胞，下层种植星形胶质细胞（图 1(c)、(d)）。用微细管道连接芯片和注射器微流泵，以实现对流体的精确控制，经过加压实验（加压用微流泵以 50μL/min 通液，无渗漏）和封接实验（用手无法将键合好的上下两层 PDMS 芯片完整分开，键合效果好），整个系统液体连贯，无漏液（图 1(f)）。

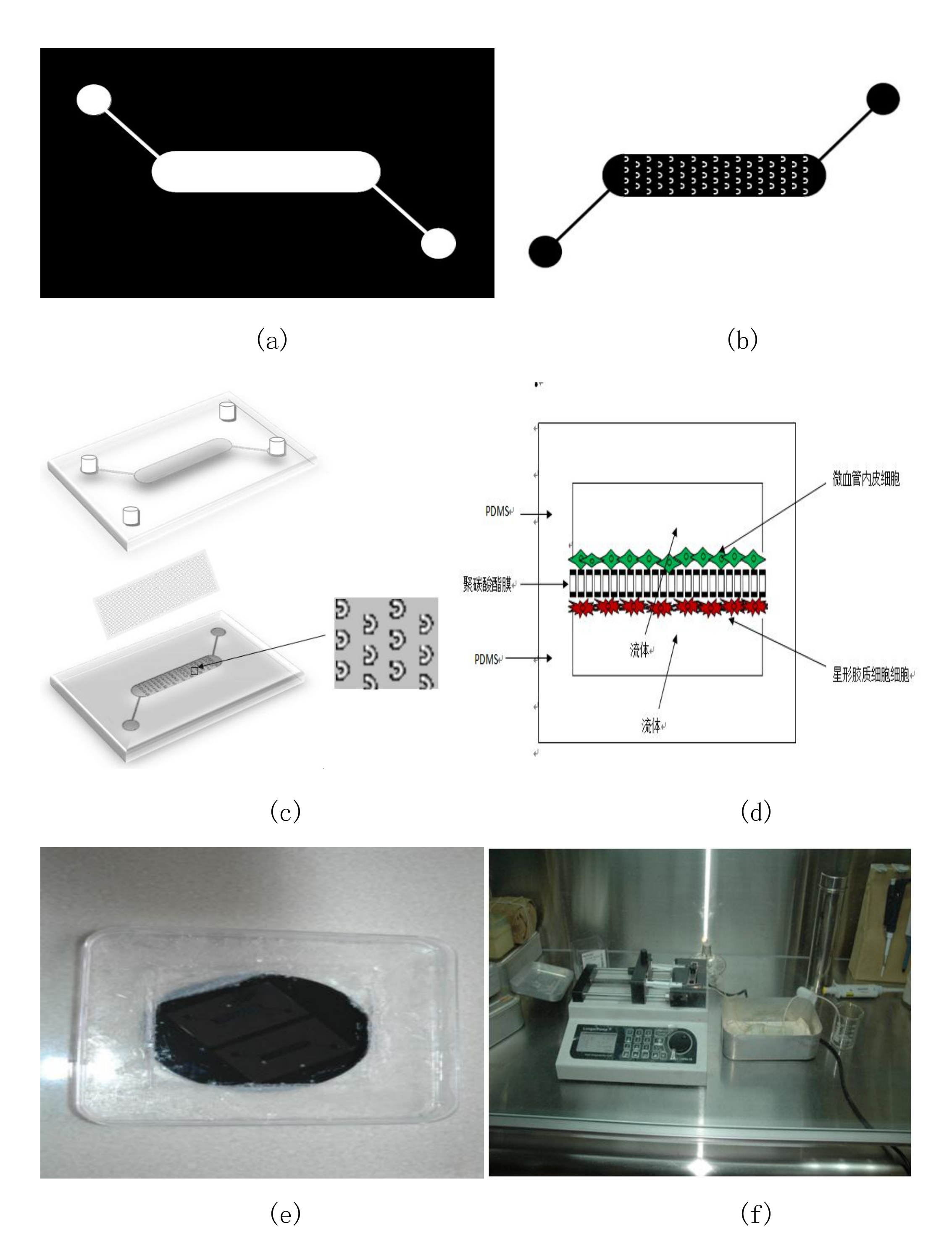


图 1　微流控芯片 BBB 模型的设计与制作

Fig. 1 Design and fabrication of BBB model for microfluidic chip

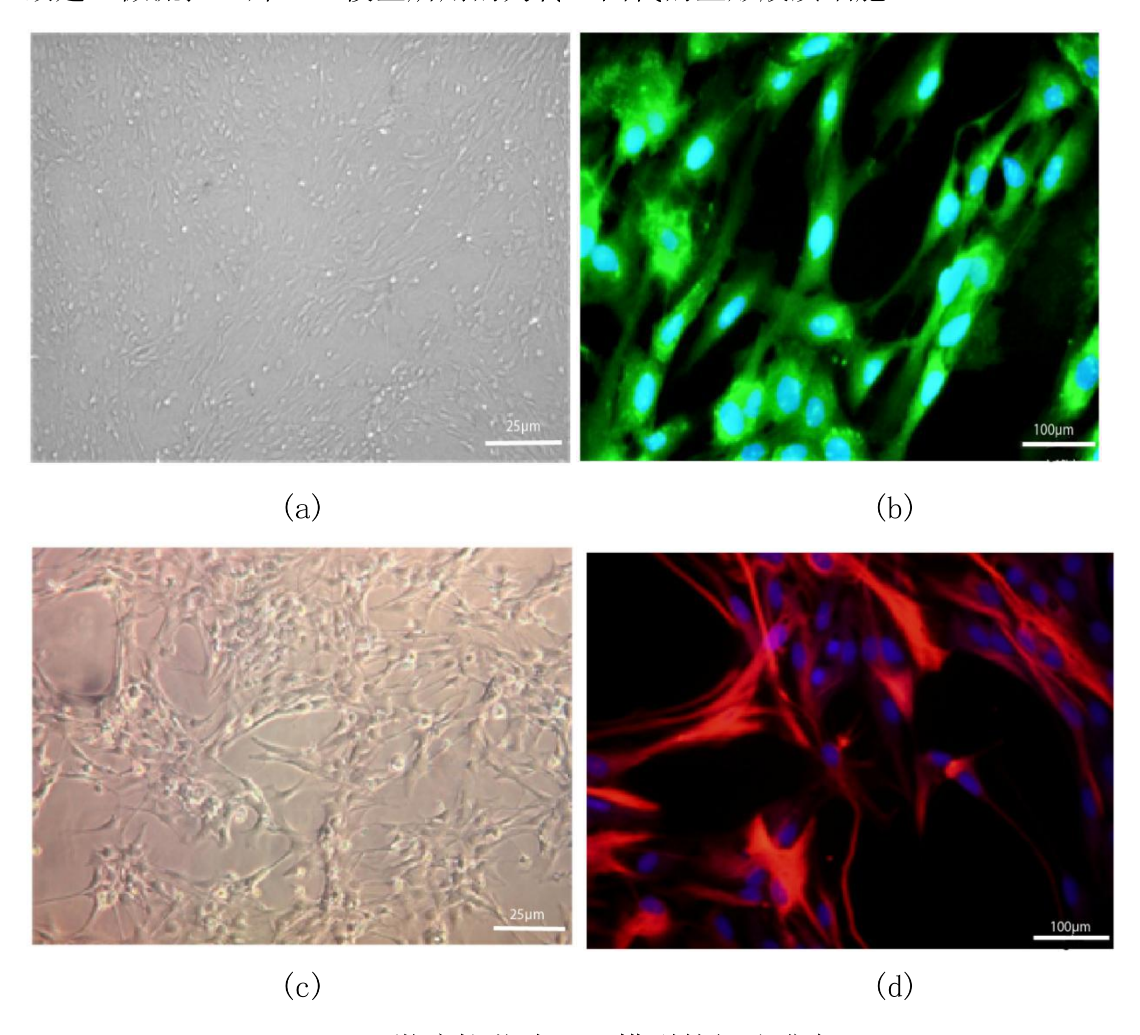
- （(a)Chip design upper layer　(b)Chip design lower layer　(c)The diagram of chip mounting　(d) The diagram of cells with chip　(e)Silicon mold　(f). Microfluidic device system）

2.2 微流控芯片体外血脑屏障模型细胞准备

脑微血管内皮细胞原代培养 7 天，细胞融合，细胞呈短梭形、多角形，可见典型的铺路石征象(图 2(a))。vWF 免疫荧光 FITC 染色，胞体呈绿色荧光，DAPI

核染色呈蓝紫色，阳性率可达 95%（图 2(b)），传代培养发现活性降低，故建立微流控芯片 BBB 模型所用的为一代的微血管内皮细胞。

星形胶质细胞培养至第 7 天，胞体明显增大，有较长突起且出现分支（图 2(c)），传至第四代细胞经 GFAP 相关抗体免疫荧光 TRITC 染色，细胞胞浆及突起红色荧光，DAPI 核染色呈蓝紫色，细胞轮廓清晰，且阳性率可达 95%（图 2(d)），故建立微流控芯片 BBB 模型所用的为传至四代的星形胶质细胞。



(a) (b)

(c) (d)

图 2 微流控芯片 BBB 模型的细胞准备

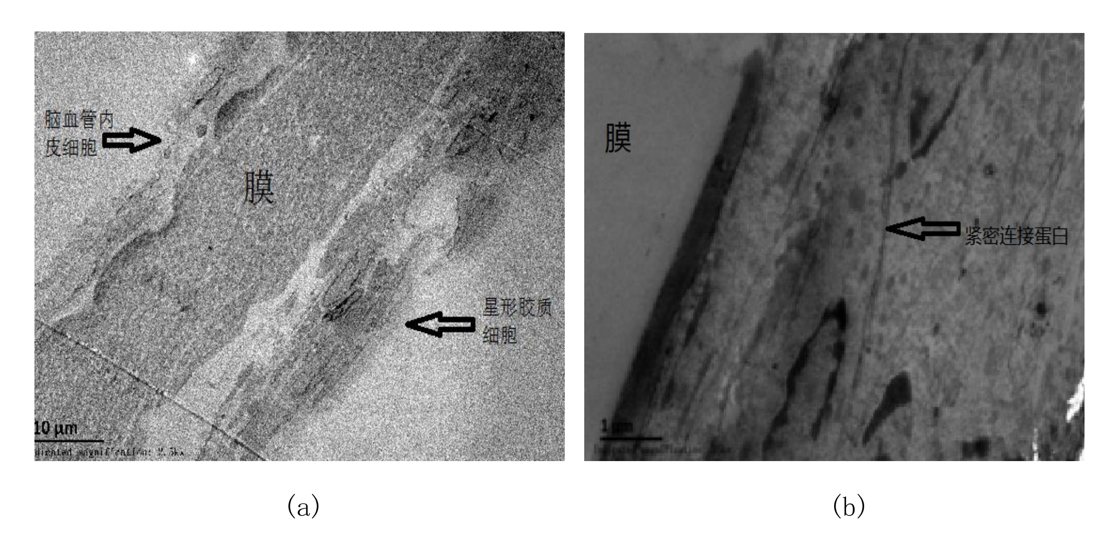
Fig.2 Cell preparation of the BBB model based on the microfluidic chip

（(a) Cerebral microvascular endothelial cells were cultured for 7 days (×100) (b) vWF staining ,DAPI staining (×200) (c) Astrocytes were purified for fourth generations (×100) (d) GFAP staining ,DAPI staining (×200)）

2.3 微流控血脑屏障模型的构建及鉴定

2.3.1 透射电镜显示上下两层细胞附着于透明聚碳酸酯膜上，细胞核明显，清晰

（图 3(a)），脑血管内皮细胞端可见紧密连接蛋白（图 3(b)）。



(a)　　(b)

图 3　微流控芯片 BBB 模型透射电镜图

Fig3 Transmission electron microscope of BBB model based on microfluidic chip

（(a) Two layers of cells were co-culture and separated by PC membranes　(b)The tight junction protein of the cerebral vascular endothelial cells）

2.3.2 荧光素钠渗透实验评价BBB模型通透性

荧光素钠渗透实验通过检测透过的荧光素量来评价细胞屏障的通透性和完整性。由图所见与微流控芯片空白模型组对比微流控芯片BBB模型组血脑屏障形成良好，能够较好的限制荧光素钠的通透性，差异有显著性（图4）。血脑屏障模型成功建立。

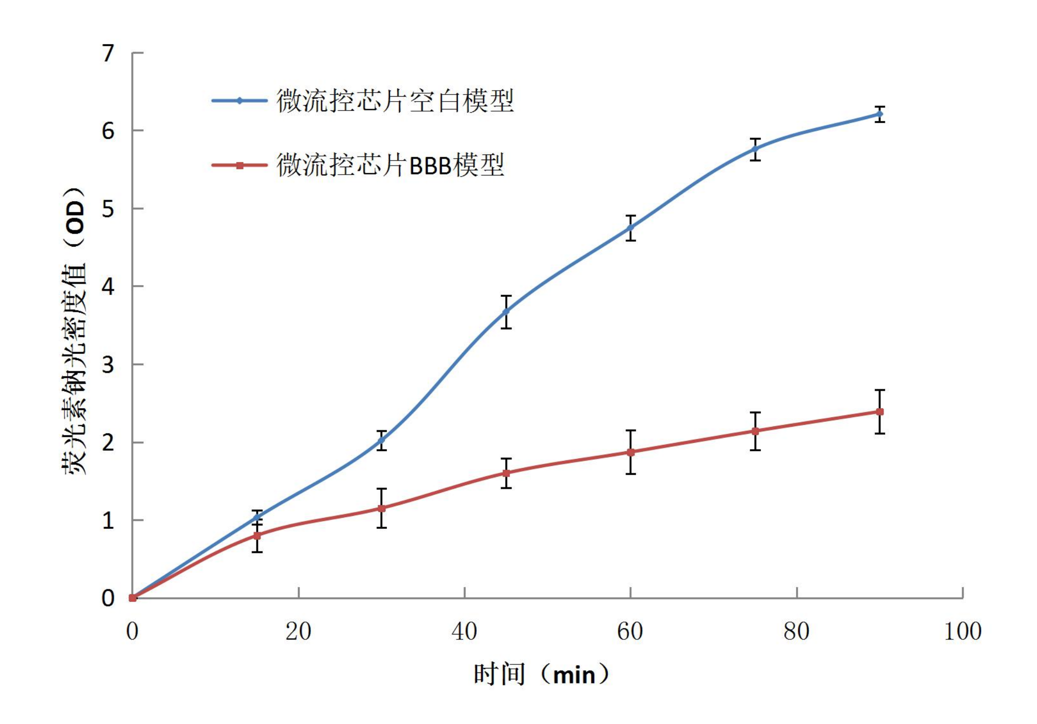


图4 微流控芯片BBB模型荧光素钠渗透实验

Fig4 The penetration experiments of fluorescein sodium with BBB model

2.3.3 跨内皮细胞间电阻（TEER）测量评价BBB模型的屏障作用

微流控芯片单层脑血管内皮细胞组和微流控芯片 BBB 模型组，在种植细胞后分别于每天上午 10 点左右测量 TEER 值，共测量至 12 天。微流控芯片空白模型的 TEER 均值维持在 72Ω·cm^2。TEER 值测量结果显示微流控芯片 BBB 模型可形成较高的跨内皮电阻，尤其以共培养五天达到峰值，其 TEER 均值在 201Ω·cm^2，此后一直到第九天都维持在较高水平，而微流控芯片单层脑血管内皮细胞组培养五天 TEER 均值为 137Ω·cm^2，此后一直维持在此水平上下。微流控芯片 BBB 模型组从第四天起一直到第九天，TEER 均值与微流控芯片单层脑血管内皮细胞组相比差异显著，直到第十天 TEER 均值下降，故微流控芯片 BBB 模型紧密连接形成的最佳时间为共培养 5-10 天（图 5）。

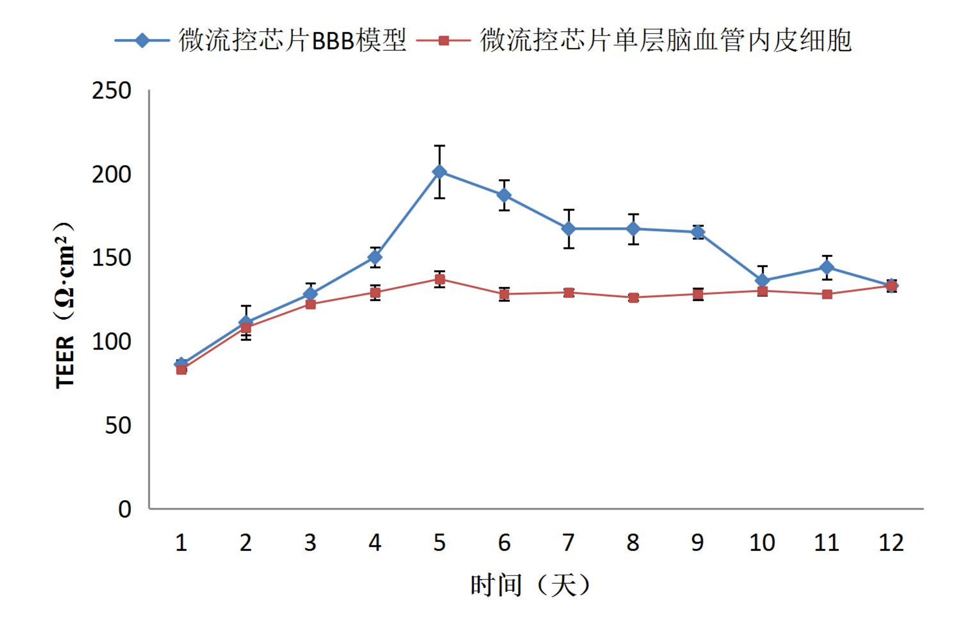


图 5、微流控芯片 BBB 模型 TEER 值测量

Fig5 The TEER measurement of BBB model

3 讨论

血脑屏障是免疫系统重要屏障之一，包括内皮细胞、基底膜、星形胶质细胞，是神经系统结构和功能的单位。血管内皮、神经胶质细胞和基底膜间需要相互联系及相互作用，才能保持其稳定的结构和功能[4]。

目前体外血脑屏障的模型难以对细胞培养的微环境进行精确的动态控制，且细胞通常不暴露于正常的机械因素，包括流体的剪切力，拉伸和压缩。忽视了体内流体流动，血液流动对组织、器官的生长和功能产生的强大影响，以及培养细胞与血液循环免疫细胞的相互作用，从而大大限制了后续的研究[5、6]。再者多种细胞所需营养物或其它物质是以扩散方式进行补给，无法及时排除细胞代谢产生的废物致使许多体外研究结果常常与在体情况不相一致。故需要寻求新的研究手段，克服这些问题，构建更加容易控制的、更加接近体内微环境的血脑屏障模型[7]。

微流控芯片技术是研究 BBB 模型的适宜平台，可通过构建各种微结构及支架，精确控制细胞分布[8]。首先微流控芯片流体的流动可以模仿不同的器官或组织之间界面的相互作用 [9]，可以模拟体内的机械因素影响，包括生理水平的流体剪切力、应变和机械压缩的影响[10]。其次微流控芯片的物质传输机制能为细胞提供充足的营养供应，排出细胞代谢产生的废物，能实现对培养体系的精确控制 [11]。

再者微流控芯片材料 PDMS 对气体有较好的通透性，保证了细胞培养过程中 O_2 和 CO_2 气体的交换。将微流控芯片连接上荧光显微镜或者流式细胞仪等外部设备，还可以对细胞生长过程进行实时监控和结果分析[12]。

本实验利用微流控芯片系统，采用由两套流路系统控制的细胞培养组件，构建了微流控芯片BBB模型，上层为血管端，下层为神经端，两个培养池长20mm，宽4mm，高100μm，中间用多孔聚碳酸酯膜隔开（0.4μm），使细胞间既有物质信号交流，又能分隔开，结构上更接近于在体情况。同时此模型通过微通道控制细胞生存环境，模拟体内物质运输形式，实现细胞与细胞之间及细胞与外界的物质交换。原代脑微血管内皮细胞培养第二代后细胞融合，细胞呈短梭形、多角形，可见典型的铺路石征象，Ⅷ因子相关抗原vWF免疫荧光染色后观察发现，细胞胞浆发出绿色荧光，细胞核用DAPI染为蓝色。星型胶质细胞培养并纯化传代至第四代时胞体明显增大，有较长突起且出现分支，符合星形胶质细胞的形态特征。经 GFAP 免疫荧光染色后，细胞胞浆及突起发出明显的红色荧光，细胞核DAPI染为蓝色细胞轮廓清晰。两种细胞都有较高的纯度和活性（>95%）。透射电镜下可见紧密链接蛋白形成且具有较高密度。荧光素钠渗透实验表明体外构建的血脑屏障细胞模型能够限制大分子物质通透性，差异有显著性，与微流控芯片空白组对比微流控芯片BBB组屏障形成良好。TEER值与细胞间紧密连接的完整性相关，实验表明微流控芯片BBB模型可形成较高的跨内皮电阻，尤其以共培养五天达到峰值，此后一直到第九天都维持在较高水平，TEER均值与微流控芯片单层脑血管内皮细胞组相比差异显著，说明微流控芯片BBB模型的紧密连接形成更好，屏障作用更强。

综上所述，实验构建的新型微流控血脑屏障模型，它在结构上更类似在体组织，能更好的模拟在体微环境，并能更好的维持血脑屏障功能。此模型有望成为一个新的平台应用于药物筛选、神经系统基础等多项研究中。

参考文献:

[1] 刘超，李明昌，陈谦学等.血脑屏障结构与功能及其在缺血性脑血管病中的研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志,2016,43(6):564-568 .

Liu C， Li CM, Chen QX, et al. The structure and function of blood-brain barrier and its progress in ischemic cerebrovascular disease . Journal of International Neurology and

Neurosurgery．2016, 43(6):564-568.

[2] 林晓梅，张铭. PDMS 微流控芯片加工技术研究.长春工业大学学报.2013, 34(2):172- 179.

Lin XM, Zhang M. Experimental Study on Fabrication of PDMS． Journal of Changchun University of Technology．2013, 34(2):172- 179.

[3] 伊波立.Tat 肽段介导的超顺磁性纳米铁颗粒通过体外血脑屏障模型的研究.华中科技大学，2010:11- 13

Yi BL. The Research of Tat Peptide-Assisting USPIO Crossing the Blood Brain Barrier Model．Huazhong University of Science and Technology, 2010:11- 13

[4] 李珺，彭亮，黄胜和等．体外血脑屏障模型的建立和发展.广东医学, 2009, 30(4):647-648

Li J，Peng L，Huang SH，et al. Establishment and development of blood-brain barrier model in vitro．Guangdong Medical Journal, 2009, 30(4):647-648

[5] Helms HC， Abbott NJ， Burek M, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. J Cereb Blood Flow Metab. 2016, 36(5):862-890.

[6] Chen L， Zheng XL， Ning HU， et al. Research Progress on Microfluidic Chip of Cell Separation Based on Dielectrophoresis． Chinese Journal of Analytical Chemistry． 2015，43(2):300-309

[7] Decrop D， Brans T， Gijsenbergh P，et al．Optical Manipulation of Single Magnetic Beads in a Microwell Array on a Digital Microfluidic Chip． Analytical Chemistry． 2016，88(17):8596-8612

[8] Jia ML， Meng Z， Yeong WY．Characterization and evaluation of 3D printed microfluidic chip for cell processing． Microfluidics and Nanofluidics． 2016，20(1):1-15.

[9] Helm M，Meer A， Eijkel J，et al． Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research． Tissue Barriers． 2016，4(1):1-13

[10] Jia ML， Meng Z， Yeong WY．Characterization and evaluation of 3D printed microfluidic chip for cell processing． Microfluidics and Nanofluidics． 2016，20(1):1-15

[11] Caplin JD，Granados NG，James MR，et al．Microfluidic Organ-on-a-Chip Technology for Advancement of Drug Development and Toxicology．Advanced Healthcare Materials．2015，4(10):1426-1431

[12] Fu Y， Zhou H， Jia C， Jing F， et al. A microfluidic chip based on surfactant-doped polydimethylsiloxane (PDMS) in a sandwich configuration for low-cost and robust digital PCR． Sensors & Actuators B Chemical． 2017，245:414-422

作者简介：蒋丽莉，34 岁，女，第三军医大学，高级实验师

通信地址：第三军医大学第一附属医院医学检验系临床检验学教研室

邮编：400038

联系电话：13983007094

E—mail：jll612@163.com